

氏 名	佐古田 久 雄
学 位 の 専 攻 分 野 の 名 称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	乙理第59号 (文部科学省への報告番号乙第355号)
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	2014年2月19日
学 位 論 文 題 目	<b>“Genetic Analysis of Alcohol-Metabolizing Enzymes in Thermophilic Bacteria and Acetic Acid Bacteria”</b>
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 藤 原 伸 介 (副査) 教 授 松 田 祐 介 教 授 山 口 宏 今 中 忠 行 (立命館大学大学院生命科学研究科教授)

## 論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、序論、本文3章、および結論からなる。

序論においては、アルコール脱水素酵素 (ADH)、アルデヒド脱水素酵素 (ALDH) の触媒機構についての概説に続いて、食酢の生産に使用されている酢酸菌と酢酸発酵 (エタノールが酸化されて食酢の主成分である酢酸が生成する) において、最も重要な機能を担う ADH および ALDH 研究の歴史的背景を紹介した。酢酸菌は、工業的に重要な微生物でありながら、研究成果の発表が少なく、主要脱水素酵素に関する知見に加えて、分子生物学的手法を用いた解析が待望されていた。近年、本学と著者らの産学共同研究によって、酢酸菌の遺伝情報に基づく育種技術が開発された。また、著者は本論文の中において、組換えプラスミドを工業的に利用する技術も開発し報告している。本研究ではこれらのアプローチに加えて応用微生物学の知見を融合し、酢酸菌の新たな利用技術を開発することを目指している。

第1章は好熱菌 *Geobacillus stearothermophilus* 由来の耐熱性アルコール脱水素酵素 (ADH-T) の触媒機構を解明し、さらに酵素の活性中心に存在するアミノ酸残基を他の残基に置換し、野生型 ADH-T とは明らかに違った特徴を有する変異酵素を作出し、その諸特性を示した。

本章では、まず ADH-T 遺伝子 (*adhT*) の構造解析に基づき、塩基配列から推定されるアミノ酸配列を2種類の酢酸菌を含む起源の異なる複数の ADH と比較し、高度に保存されているアミノ酸残基があることを認めた。これらは高次構造に基づいて触媒機構が提案されているウマ由来の ADH においても保存されていることを見出した。比較解析の結果、ADH-T の触媒機構は亜鉛 (Zn) とスレオニン残基 (Thr40) のヒドロキシル基、ヒスチジン残基 (His43) のイミダゾール環から構成されていると推定された。著者は、部位特異的変異導入法によって、ADH 活性中心のアミノ酸残基をアラニンなどの活性基を持たないアミノ酸残基へ置換し作成した変異型 ADH-T が酵素活性を有しないことから、ADH-T の触媒機構を解明した。さらに、活性中心に存在する塩基性アミノ酸残基 (His43) をさらに塩基性の強いアミノ酸 (アルギニン) 残基に変換した変異酵素 (His43Arg) を作出した。変異酵素 (His43Arg) の至適 pH は野生型酵素に比較して、大きくアルカリ性にシフト (pH7.8 から pH9.0) した。

耐熱性アルコール脱水素酵素 (ADH-T) は、枯草菌を宿主とした発現系を用いることによって、大量か

つ安定に生産可能であることを示した。ADH-T の耐熱特性を利用し、形質転換体の無細胞抽出液を熱処理することによって、常温菌である宿主由来のタンパク質が容易に除去できた。複数の変異酵素を上記の手法で精製し、野生型 ADH-T および他の変異酵素の諸特性を調べた。

第2章では、*G. stearothermophilus* 由来の耐熱性アルデヒド脱水素酵素 (ALDH-T) 遺伝子 (*aldhT*) の構造解析を行った。塩基配列から予想されるアミノ酸配列を2種類の酢酸菌を含む起源の異なる複数の ALDH と比較したところ、高度に保存されているアミノ酸残基 (Glu255, Cys289) があり、これらは先行して高次構造に基づく触媒機構が提案されているヒト由来の ALDH においても保存されていることを見出した。さらに、大腸菌を宿主とした形質転換体において、効率的に生産する手法を示した。培地に、エタノールを添加すると、酵素の発現が誘導されることから、形質転換体を用いて大量かつ安定的に ALDH-T を得ることができた。ALDH-T の耐熱特性を利用して、第1章で述べた ADH-T と同様に、形質転換体から容易に精製可能であった。この精製酵素を用いて、ALDH-T の基質特異性に関する解析を行った。序論に述べたように、酢酸菌の ADH および ALDH に関する知見は非常に少なく、第1章および第2章の結果は酢酸菌のアルコール代謝に関する知見を補完するものである。

第3章においては、組換えプラスミドの安定性に関する新しい概念を提案するとともに、実生産に応用可能な遺伝子組換え体を作成した。形質転換体による物質生産においては、組換えプラスミドが安定して宿主に維持されることが、極めて重要である。本章では宿主が次の3件の要項を満たすことによって、組換えプラスミドにコードされた薬剤耐性遺伝子に対応する抗生物質を培養系に添加することなく、組換えプラスミドが安定的に宿主に維持されることを示した。本章では、大腸菌 *Escherichia coli* によるトリプトファン生産系をモデルとした。

宿主が必要とする3要件とは、(i) 必須栄養素生産能を欠き、(ii) 外部から当該必須栄養素を取り込む能動輸送能を欠き、さらに (iii) 当該必須栄養素生産能をコードする遺伝子を有する組換えプラスミドを導入することが可能であることである。

このような形質の宿主に必須栄養素生産能をコードする遺伝子を有する組換えプラスミドを導入すると、得られた形質転換体は、完全培地、および必須栄養素を含有しない任意の培地（最少培地を含む）のいずれにおいても安定した増殖が可能である。かつ導入された組換えプラスミドが脱離すると、プラスミド脱離株はいずれの培地においても増殖が極めて悪くなり、組換えプラスミド保持株のみが優位に増殖する。すなわち、組換えプラスミドが宿主中に安定に保持されることとなる。このように、上記の宿主を用いると、従来のように特定の薬剤を使用することなく、菌体内に組換えプラスミドが安定に保持され得る。さらに、薬剤を添加することなく、完全培地を利用することが可能であるため、広範囲の培地原料が利用され得る。菌体外へ必須栄養素が放出されるような場合にも本法の利用が可能である。本手法は、形質転換系を有する細菌であれば宿主を選ばず、また、微生物の必須栄養素であれば、全てのアミノ酸、ビタミン類を生産物とすることが可能である。

結論においては、好熱菌からクローニングされた ADH-T 遺伝子 (*adhT*) および ALDH-T 遺伝子 (*aldhT*) による遺伝学的解析を行い、好熱菌に留まらないアルコール代謝系酵素について考察を行なった。さらに、工業的に利用価値の高い組換えプラスミドの安定性の概念を総括し、微生物種を超えた利用の広がりを展望した。

## 論文審査結果の要旨

酢酸菌の酢酸発酵（エタノールが酸化されて食酢の主成分である酢酸が生成する）において、重要な機能を担うアルコール脱水素酵素（ADH）、アルデヒド脱水素酵素（ALDH）は、細胞膜および細胞質に局在している。細胞膜結合型の ADH, ALDH においては触媒機構の解明が進んでいる。一方、細胞質内におけるアルコール代謝および細胞質 ADH, ALDH の触媒機構は不明な点が多い。それはこれらの酵素分子が不安定で容易に入手できず、生化学的解析がなされなかったためである。酢酸菌と同じ好気呼吸を行う真正細菌に好熱菌 *Geobacillus stearothermophilus* があるが、本菌の酵素は細胞内アルコール代謝を考える上で参考となる知見をもたらすと考えられた。本研究では *G. stearothermophilus* から ADH および ALDH を取得し、触媒機構を考察した。また、その知見をもとに酢酸菌内でのアルコール代謝系の代謝フラックスを推察している。さらに細胞の栄養素を取り込む機構に注目したユニークなプラスミド安定化法を確立し、抗生物質耐性を用いない新規の選択系を提案している。この手法を ADH および ALDH に関する知見とともに用いることで、酢酸菌を宿主とする物質生産系の可能性を示した。本研究の成果は、これまで未解明だった好気性微生物の細胞質内 ADH および ALDH の生化学的機能を解明するとともに、抗生物質など薬剤を利用しないプラスミド選択系を提案していることである。発表されている学術論文は、現在も引用され続けており、生化学的な解析結果は高く評価されている。本研究で得られた知見は好熱菌、酢酸菌に限らず、各種アミノ酸発酵などの物質生産の現場に応用でき、技術としての完成度も高い。

本論文の学術的重要性は以下の点にまとめられる。

- (1) 細胞質内アルコール脱水素酵素として好熱菌 *Geobacillus stearothermophilus* 由来の酵素（ADH-T）に注目し、触媒機構を解明した。従来なしえなかった機能解析を好熱菌の耐熱性酵素を利用することで達成している。さらに酵素の活性中心に存在するアミノ酸残基を他の残基に置換し、野生型 ADH-T とは明らかに違った特徴を有する変異酵素を作出し、その諸特性を解析した。特に人為的に酵素の反応至適 pH をシフトさせることにも成功した点は酵素工学的にも意義深い。
- (2) アルデヒド脱水素酵素として同じく好熱菌 *G. stearothermophilus* 由来の酵素（ALDH-T）に注目し、触媒機構を解明した。また、この遺伝子発現にはエタノール誘導性、カタボライト感受性がみられることが示された。ここで得られた知見は先の ADH-T の知見と合わせて、酢酸菌のアルコール代謝に関する酵素学的知見を補完するものである。
- (3) 組換えプラスミドの安定性に関する新しいコンセプトを提案するとともに、実生産に応用可能な遺伝子組換え体を作成した。外部から当該必須栄養素を取り込む能動輸送能を欠くことで選択性と安定性が飛躍的に向上している。今回の研究ではトリプトファン生産をモデルに検討されているが、微生物の必須栄養素であれば、全てのアミノ酸、ビタミン類を生産物とすることが可能である。汎用性が高く物質生産系を効率化する上で有用な技術になりうる。

本論文の内容は、すでに Journal of Bacteriology および Journal of Fermentation and Bioengineering に 5 編の英語論文として公表されている。また、1 編の著作が印刷中となっている。さらに、3 編の関連論文および著作が発行されている。著者は、日本生物工学会などにおいて、5 回にわたり本論文の内容を自ら発表している。審査委員会は本論文の内容を中心に面接と公開の論文発表会を行い、著者が論文内容と用いた手法について、十分な理解と関連する分野における学識を有し、また将来の研究において遂行能力を持つことを確認した。本学位申請論文の研究成果は英語論文として、当該分野の著名な査読付き学術雑誌に掲載されている。また、勤務するマルカン酢株式会社の海外法人 (Marukan Vinegar USA Inc.) の副社長就任時には、

製造担当として現地社員の指導を行っており十分な英語能力を持つと判断した。

以上のことより、審査委員会は本論文の著者が博士（理学）の学位を授与されるに足る十分な資質を有するものと判定する。